



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR PARA
DETECÇÃO DE TROPONINA CARDÍACA UTILIZANDO
NANOPARTÍCULAS DE OURO E NANOPLAQUETAS DE
GRAFITE**

NICOLE ZANATO
Profa. Dr^a IOLANDA CRUZ VIEIRA

Florianópolis
Julho/2016

Nicole Zanato

**DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE
TROPONINA CARDÍACA UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE OURO E
NANOPLAQUETAS DE GRAFITE**

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Orientadora: Profa. Dr^a Iolanda Cruz Vieira

Florianópolis
Julho/2016

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais, Gicela e Cesar por tudo o que já fizeram por mim e todo o apoio às minhas decisões.

À minha irmã Giulia e meu irmão César Augusto pelos bons momentos compartilhados.

Ao meu namorado Lucas por percorrer esse caminho ao meu lado me ajudando e incentivando.

Aos meus dindos Vera e Ivar e minha prima Vanessa pelos passeios e por sempre se preocuparem comigo.

À Ivete e ao Volni por serem minha segunda família.

À minha orientadora Profa. Dr^a Iolanda Cruz Vieira pelos ensinamentos e dedicação.

Ao Prof Dr. Eduardo Zapp e ao Prof. Dr. Paulo Sérgio da Silva por guiarem meus primeiros passos no LaBios.

A todos colegas e ex-colegas do Laboratório de Biossensores (LaBios), Stephani, Aline, Larissa, Patrícia Brugnerotto, Nicolas e especialmente Alessandra e Tânia que sempre estiveram disponíveis a me ajudar.

A todos professores que contribuíram para o meu crescimento.

A todos amigos e colegas, especialmente: Patrícia Felini, Emanuelle, Renato, Leonardo, Beatriz, Lucas Morés, Lucas Murara, Sheila, Joseane, Marcos, Thiago, Ana Maria, Eduardo, Marco, Schayana, Caio e Alechania que de alguma forma me ajudaram durante a graduação.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME) pelas medidas de microscopia.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Departamento de Química.

À Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DA LITERATURA	9
2.1. Imunossensores.....	9
2.2 Troponina Cardíaca T	11
2.3. Nanopartículas de Ouro.....	12
2.4. Nanoplaquetas Esfoliadas de Grafite	12
2.5. Técnicas Voltamétricas	13
2.5.1. <i>Voltametria de Pulso diferencial</i>	14
3. OBJETIVO GERAL.....	15
3.1. Objetivos específicos	15
4. METODOLOGIA	16
4.1. Reagentes e Soluções	16
4.2. Equipamentos	17
4.3. Construção do Imunossensor	17
4.4. Construção da Curva de Calibração	18
4.5. Estudo dos Possíveis Interferentes	18
4.6. Determinação de TnT em Plasma	19
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1. Caracterização das AuNP-Hep.....	20
5.2. Otimização do Método	20
5.2.1. <i>Proporção dos Modificadores</i>	21
5.2.2. <i>Estudo do Tempo de Imobilização do Anticorpo e Incubação do Antígeno</i>	22
5.2.3. <i>Otimização dos parâmetros da DPV</i>	24
5.3. Avaliação dos Componentes Utilizados na Construção do Imunossensor	25
5.4. Princípio de Funcionamento do Imunossensor	26
5.5. Desempenho Analítico do Imunossensor	27
5.5.1. <i>Curva de Calibração</i>	27
5.5.2. <i>Estudo dos Possíveis Interferentes</i>	28
5.5.3. <i>Determinação de TnT em Plasma</i>	29
6. CONCLUSÃO	30
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de imunossensor <i>marcado</i> e resposta esperada.	10
Figura 2. Imunossensor <i>não marcado</i> e resposta eletroquímica em: (a) ausência de antígeno e (b) presença de antígeno.	11
Figura 3. (a) Representação da aplicação de potencial em voltametria de pulso diferencial. (b) Exemplo de voltamograma em voltametria de pulso diferencial.	15
Figura 4. (a) Imagem de TEM para as AuNP-Hep. Inserido: histograma referente à aproximadamente 300 partículas escolhidas arbitrariamente as imagens de TEM. (b) Imagem de TEM para as AuNP-Hep/xGnP.	20
Figura 5. Estudo da influência da proporção AuNP-Hep/xGnP sobre a resposta do imunossensor.	21
Figura 6. Estudo da influência da quantidade de ab-TnT sobre a resposta do imunossensor.	22
Figura 7. Estudo do tempo de imobilização do anticorpo.	23
Figura 8. Estudo do tempo de incubação do antígeno	24
Figura 9. Estudo do efeito dos parâmetros da técnica de pulso diferencial na resposta analítica do imunossensor: (a) incremento (2 – 10 mV); (b) amplitude (25 – 100 mV); (c) intervalo de tempo (20 – 60 ms).	25
Figura 10. Estudo da contribuição dos modificadores na construção do imunossensor.	26
Figura 11. (a) Obtenção do pico base. (b) Esquema da formação do imunocomplexo e supressão em relação ao pico base.	27
Figura 12. Voltamogramas (a) e Curva de calibração (b) para troponina T utilizando o imunossensor proposto em condições otimizadas.	28
Figura 13. Estudo dos possíveis interferentes presentes no plasma sanguíneo.	29

LISTA DE ABREVIATURAS

TnT – Troponina T

IAM – Infarto agudo do miocárdio

AuNP-Hep – Nanopartículas de ouro estabilizadas em heparina

xGnP – Nanoplaquetas esfoliadas de grafite

ab-TnT – Anticorpo para troponina T

DPV – Voltametria de pulso diferencial (do inglês, *Differential Pulse Voltammetry*)

ECLIA – Ensaio de eletroquimioluminescência

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática

AuNP – Nanopartículas de ouro

PBS – Tampão fosfato salino

Ag/AgCl – Eletrodo de referência prata/cloreto de prata

TEM – Microscopia Eletrônica de Transmissão (do inglês, *Transmission Electron Microscopy*)

GCE – Eletrodo de carbono vítreo (do inglês, *Glassy Carbon Electrode*)

RESUMO

A troponina cardíaca T (TnT) faz parte de um complexo de três proteínas (I, C e T) envolvidas no processo de contração dos músculos esquelético e cardíaco. Quando há lesão cardíaca a TnT é liberada na corrente sanguínea, sendo considerada um biomarcador para auxílio na identificação de infarto agudo do miocárdio (IAM). Neste trabalho, um imunossensor foi desenvolvido com objetivo de detectar TnT em plasma sanguíneo a partir da modificação da superfície de um eletrodo de carbono vítreo com filme de nanopartículas de ouro estabilizadas em heparina (AuNP-Hep) contendo nanoplaquetas de grafite (xGnP), anticorpo (ab-TnT) e Nafion. Solução de hidroquinona ($3,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) foi utilizada como sonda redox e solução tampão fosfato salino (0,01 mol L⁻¹, pH 7,4) como eletrólito de suporte. A técnica selecionada foi a voltametria de pulso diferencial, os parâmetros voltamétricos foram investigados e as melhores respostas foram obtidas utilizando 2 mV de incremento, 100 mV de amplitude e 40 ms de intervalo de tempo. O melhor desempenho do imunossensor foi obtido usando 1 mg de xGnP, 200 µL de AuNP-Hep e 20 µL de ab-TnT. A melhor resposta do imunossensor foi obtida com tempo de imobilização de 15 min do anticorpo e tempo de incubação de 20 min para o antígeno (amostra). Após otimização dos parâmetros experimentais, a curva de calibração foi obtida com concentrações crescentes deste biomarcador cardíaco de 0,05 a 0,35 ng mL⁻¹ e limite de detecção de 0,016 ng mL⁻¹, utilizando a voltametria de pulso diferencial. Esse imunossensor foi usado com sucesso na determinação de TnT em amostra simulada de plasma humano, e apresentou erro aceitável de 6,7%. Compostos presentes em amostra de plasma foram investigados como potenciais interferentes sobre a resposta do imunossensor, e como resultado observou-se baixo nível de interferência (inferior a 12%). Indivíduos saudáveis possuem nível sanguíneo de TnT inferior a 0,01 ng mL⁻¹ e o teor de 0,3 ng mL⁻¹ foi estabelecido como critério para o diagnóstico do IAM. Diante dos resultados obtidos, conclui-se que o imunossensor proposto é capaz de detectar níveis clínicos aceitáveis para TnT, mostrando-se uma ferramenta útil para o diagnóstico precoce, apresentando baixo tempo de análise (20 min) e fácil construção.

Palavras-chave: imunossensor, troponina cardíaca, nanopartículas de ouro.

1. INTRODUÇÃO

O infarto agudo do miocárdio (IAM) é uma das principais causas de morte em nível mundial. Nas últimas décadas, o número de pessoas que vêm a óbito devido a IAM tem diminuído graças a avanços na área médica. Para que essa tendência continue é essencial que o diagnóstico seja imediato.

A troponina cardíaca T (TnT) é uma proteína presente no miocárdio, liberada na corrente sanguínea durante o IAM. Considerada um biomarcador cardíaco utilizado no diagnóstico, atua como antígeno para o anticorpo específico. Diversos procedimentos são empregados na identificação do IAM, dentre eles, o monitoramento de biomarcadores cardíacos, onde níveis elevados, juntamente com outros sintomas clínicos, podem indicar IAM.

O desenvolvimento de imunossensores que se baseiam na variação da resposta de corrente (eletroquímicos) a partir da ligação específica entre o anticorpo e o antígeno (formação de um imunocomplexo), vêm ganhando destaque nos últimos anos devido a sensibilidade, velocidade das análises e o baixo custo operacional que estes dispositivos podem apresentar. Estes sensores eletroquímicos podem ser modificados a fim de se proporcionar um aumento de sensibilidade.

Uma maneira de modificação de sensores é por deposição de um filme sobre um eletrodo sólido. A composição do filme a ser depositado sobre o eletrodo é responsável por aprimorar e incrementar a resposta analítica do sensor. Para isso, são utilizados alguns compostos como nanomateriais, capazes de imobilizar moléculas biológicas, além de aumentar a resposta do biossensor e polímeros, responsáveis pela fixação do filme na superfície do eletrodo.

A combinação dos nanomateriais (AuNP-Hep e xGnP) utilizados na construção do imunossensor proposto neste trabalho favorecem o aumento da sensibilidade na detecção de troponina T em plasma sanguíneo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

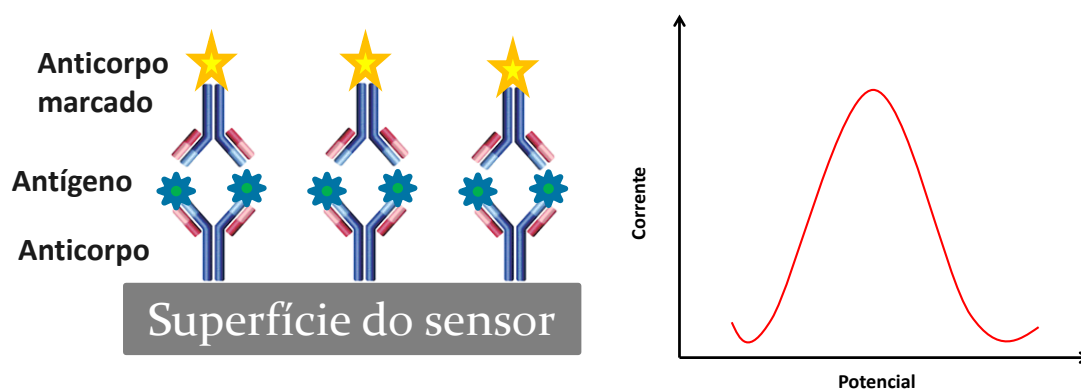
2.1. Imunossensores

Imunossensores são dispositivos analíticos da classe dos biossensores, que detectam e transmitem informações referentes a mudanças bioquímicas envolvendo a integração de um elemento biológico com uma interface eletrônica. Esta integração é capaz de converter um sinal biológico em uma resposta elétrica que é proporcional a concentração do analito. Os imunossensores são capazes de reconhecer um anticorpo ou antígeno específico através da formação de um imunocomplexo antígeno-anticorpo. O evento de reconhecimento é detectado e convertido, por meio de um transdutor, a um sinal mensurável (como corrente elétrica, por exemplo). A transdução do sinal acontece por diferentes meios, devido as mudanças de propriedades ou geração de sinal que ocorrem devido à formação do imunocomplexo. Os principais transdutores utilizados em imunossensores são os eletroquímicos, ópticos e piezoelétricos. Dentre os eletroquímicos, existem os potenciométricos, amperométricos e condutimétricos.¹⁻³

Imunossensores amperométricos aplicados na detecção de doenças graves tem sido amplamente estudados devido a vantagens como baixos limites de detecção, alta especificidade e boa seletividade na análise de amostras complexas utilizando processos e instrumentos relativamente simples.⁴

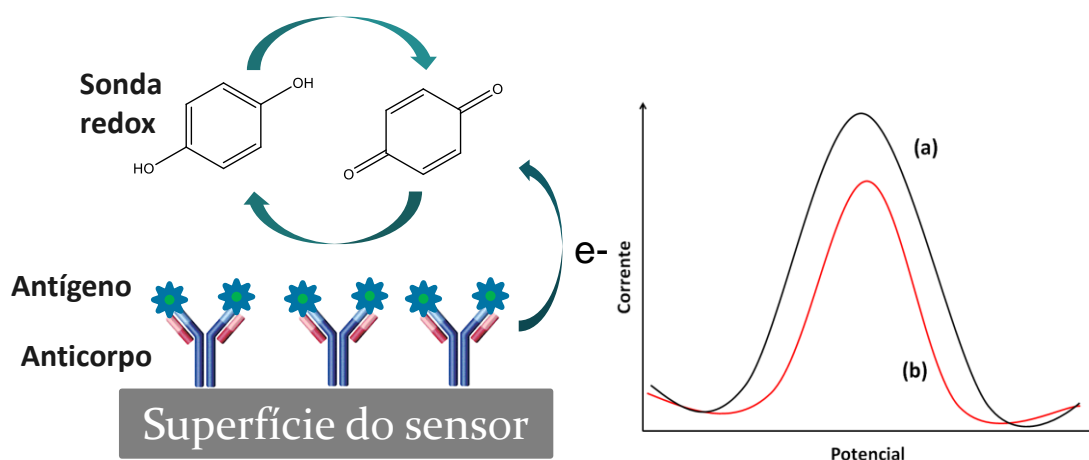
Dentre os imunossensores eletroquímicos podem ser citados os *marcados* e *não marcados*. Em geral, o antígeno e o anticorpo são espécies eletroquimicamente inertes, portanto, o desenvolvimento de um imunossensor requer uma estratégia para monitorar a reação de afinidade. No imunossensor do tipo *marcado* modificado com anticorpo ocorre à interação com o analito (antígeno) formando o imunocomplexo e em seguida são adicionados anticorpos marcados por enzimas ou moléculas capazes de sofrer oxidação e redução (sonda redox) que serão responsáveis pela geração do sinal. A Figura 1 mostra uma representação de um imunossensor *marcado*.^{3, 5-7}

Figura 1. Modelo de imunossensor *marcado* e resposta esperada.



Os imunossensores *não marcados* empregam moléculas com atividade redox bem estabelecida (hidroquinona, ferroceno, cristais líquidos com grupos eletroativos e enzimas oxirredutases, por exemplo), como sondas eletroquímicas. Estas sondas podem estar tanto em solução como imobilizadas na superfície do eletrodo. Neste tipo de estratégia inicialmente é feito a medida do pico base, que é referente a resposta eletroquímica da sonda empregando o imunossensor contendo apenas o anticorpo (Figura 2 (a)), e, após a imobilização do antígeno uma nova medida é registrada como apresentada na Figura 2 (b). A formação do imunocomplexo pode ser observada pela supressão do sinal em relação ao sinal inicial (pico base). Esta supressão é proporcional a concentração do antígeno que bloqueia parcialmente a superfície eletroativa do imunossensor. A Figura 2 mostra uma representação de imunossensor *não marcado*.^{3, 5-7}

Figura 2. Imunossensor *não marcado* e resposta eletroquímica em: (a) ausência de antígeno e (b) presença de antígeno.



2.2. Troponina Cardíaca T

A Troponina consiste em um complexo de três proteínas globulares (I, C e T), é encontrada no miocárdio e tem a função de regular o processo de contração. As troponina I e T são específicas para o músculo cardíaco e são reconhecidas como biomarcadores de lesão miocárdica.⁸⁻⁹

Após a ocorrência de um IAM, mioglobina, troponina I, troponina T e creatina quinase são liberados na corrente sanguínea, de forma que, a detecção destes marcadores cardíacos no soro sanguíneo auxilia na geração de um diagnóstico precoce e correto.⁷

Segundo a Organização Mundial da Saúde, indivíduos saudáveis apresentam níveis de TnT abaixo de $0,01 \text{ ng mL}^{-1}$. Sendo diagnosticado IAM quando o indivíduo apresenta concentração de $0,3 \text{ ng mL}^{-1}$ deste biomarcador na corrente sanguínea. Em aproximadamente 3 a 4 horas após o evento, o nível de troponina T no sangue ultrapassa $0,3 \text{ ng mL}^{-1}$.⁷

Geralmente, os métodos utilizados para detecção de TnT são ensaio de eletroquimioluminescência (ECLIA) e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Porém estes métodos não são portáteis e requerem processos que só podem ser realizados em um laboratório clínico, o que não é apropriado para um diagnóstico rápido no caso de uma emergência cardíaca. Neste contexto, imunossensores desenvolvidos a partir da modificação de eletrodos com

diversos materiais (nanomateriais, biomoléculas, material polimérico) podem ser alternativas interessantes para essa aplicação, principalmente devido à velocidade de análise e possibilidade de miniaturização do sistema analítico que pode permitir portabilidade.¹⁰

2.3. Nanopartículas de Ouro

Em nanoescala algumas propriedades específicas podem ser exibidas, tais como, grande área superficial ativa, atividade catalítica e propriedades ópticas únicas, que geralmente não estão presentes em materiais em grande escala. Entretanto, nanopartículas metálicas são termodinamicamente instáveis e possuem tendência natural de agregação, provocando a diminuição da área superficial por átomo e a perda de propriedades interessantes dependentes do tamanho. Para evitar a agregação, diferentes materiais têm sido usados como agentes estabilizantes como por exemplo, polímeros, líquidos iônicos e surfactantes.¹¹⁻¹³

O uso de nanopartículas de ouro (AuNP) na construção de biossensores tem sido vastamente reportado na literatura, e descreve entre várias vantagens o aumento da sensibilidade e a facilidade de transferência de elétrons.¹⁴⁻¹⁵

As AuNP também podem atuar como plataforma para a imobilização de biomoléculas, preservando sua bioatividade e fornecendo um microambiente estável. Desta forma, AuNP podem ser úteis quando se deseja incorporar algum material biológico na superfície de eletrodos. Estudos recentes mostram que a biocompatibilidade das nanopartículas de ouro é altamente vantajosa, permitindo a incorporação de biomoléculas tais como enzimas e proteínas em sistemas eletroquímicos.¹¹⁻¹³

2.4. Nanoplaquetas Esfoliadas de Grafite

Nanoplaquetas esfoliadas de grafite (xGnP) têm atraído recentemente a atenção de pesquisadores pois apresentam excelentes propriedades mecânicas, estruturais, térmicas e elétricas. Além disso, as xGnPs são uma alternativa de baixo custo que apresentam propriedades similares às aquelas apresentadas pelos nanotubos de carbono principalmente em relação à

adsorção, devido à sua estrutura lamelar. Estas plaquetas consistem de átomos de carbono hibridizados em sp^2 arranjados em folhas ao invés da estrutura cilíndrica encontrada nos nanotubos.¹⁶⁻¹⁷

As xGnP apresentam-se promissoras na área de sensores eletroquímicos. Artigos recentes relatam aumento pronunciado na resposta de corrente em sensores eletroquímicos devido as suas propriedades condutoras e aumento da área superficial desse nanomaterial.¹⁶⁻¹⁸

2.5. Técnicas Voltamétricas

A voltametria é um conjunto de técnicas eletroanalíticas que se baseia nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente à essa superfície. As medidas voltamétricas ocorrem em célula eletroquímica que é constituída de três eletrodos (trabalho, referência e contra-eletrodo) imersos em uma solução contendo o analito e também um excesso de um eletrólito não reativo chamado eletrólito de suporte. O eletrodo de trabalho, cujo potencial em relação a um eletrodo de referência varia linearmente com o tempo, é a superfície onde ocorre a reação de interesse, podendo ser modificado com diferentes materiais a fim de melhorar a sensibilidade na detecção do analito. O eletrodo de referência (geralmente Ag/AgCl ou calomelano saturado) tem um potencial conhecido e que permanece constante durante o experimento. Nessa técnica, as informações sobre o analito são obtidas por meio da medição da magnitude da corrente elétrica que surge entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo. Logo, o contra-eletrodo tem a função de auxiliar a passagem de corrente na célula, impedindo que ela passe pelo eletrodo de referência.¹⁹⁻²⁰

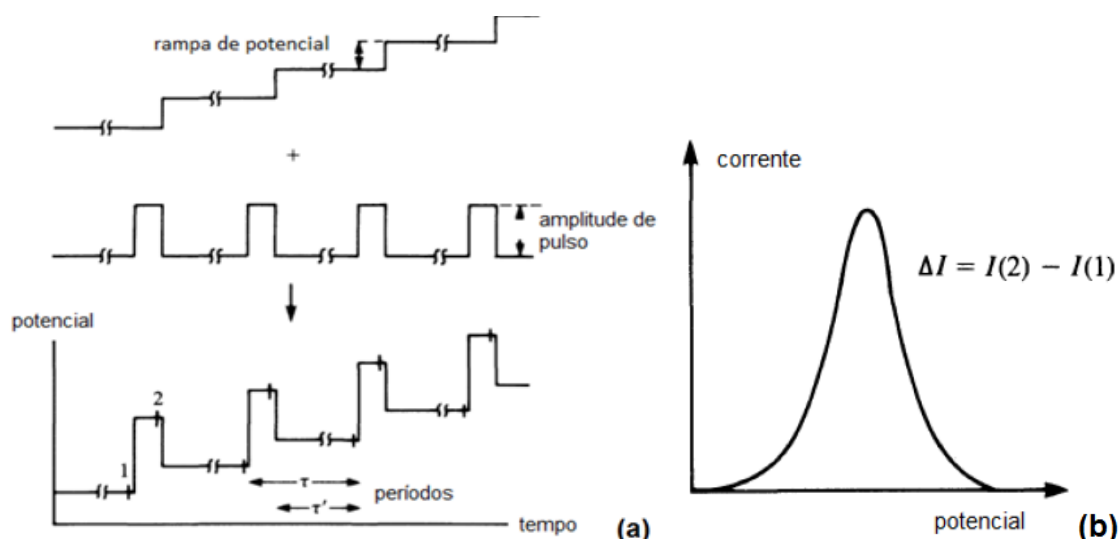
Essa técnica é classificada como dinâmica, pois a célula eletroquímica é operada na presença de corrente elétrica que, por sua vez, é medida em função da aplicação de um potencial. A corrente observada na interação do analito com o eletrodo (oxirredução) é a faradáica (denominada assim por obedecer à lei de Faraday), e é proporcional à concentração de analito ativo no seio da solução. O outro tipo de corrente gerada, a capacitiva, não é proporcional à concentração do analito e não obedece à lei de Faraday, sendo necessária sua minimização. A forma na qual o potencial é aplicado, e por

consequência a forma como a resposta analítica é adquirida, irá denominar o tipo da técnica voltamétrica, podendo ser voltametria de varredura linear, voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada e voltametria de pulso diferencial.¹⁹⁻²¹

5.5.2. Voltametria de Pulso Diferencial

Dentre as técnicas voltamétricas, destacam-se as técnicas pulsadas, como a voltametria de pulso diferencial (DPV). Nesta técnica, a corrente capacitiva é minimizada devido à aplicação de pulsos de amplitude fixos sobrepostos a uma rampa de potencial crescente aplicado ao eletrodo de trabalho (Figura 3 (a)). A corrente é medida duas vezes, uma antes da aplicação do pulso e outra ao final do pulso. A primeira medida é instrumentalmente subtraída da segunda, e a diferença é plotada *versus* o potencial aplicado. O voltamograma resultante consiste de picos de forma gaussiana, cuja altura é diretamente proporcional à concentração do analito (Figura 3 (b)). Subtraindo o valor da primeira leitura da segunda, obtém-se uma minimização da contribuição da corrente de fundo. Desta forma, este tipo de técnica apresenta sensibilidade elevada, permitindo limites de detecção da ordem de $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.¹⁹⁻²⁰

Figura 3. (a) Representação da aplicação de potencial em voltametria de pulso diferencial. (b) Exemplo de voltamograma em voltametria de pulso diferencial.²¹



3. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um imunossensor para a detecção de TnT em amostras de plasma sanguíneo, por DPV, a partir da modificação da superfície de um eletrodo de carbono com filme de AuNP-Hep contendo xGnP, ab-TnT e Nafion, utilizando hidroquinona como sonda redox.

3.1. Objetivos Específicos

- Sintetizar e caracterizar as AuNP-Hep;
- Estudar a proporção dos modificadores (AuNP-Hep e xGnP) para a construção do imunossensor;
- Avaliar a quantidade de ab-TnT e estudar o tempo de imobilização;
- Estudar o tempo de incubação do antígeno;
- Otimizar os parâmetros da técnica de voltametria de pulso diferencial;
- Construir curva de calibração para TnT;
- Investigar possível interferência de compostos presentes em amostras biológicas;
- Realizar a determinação de troponina T em amostra de plasma sanguíneo empregando o imunossensor proposto.

4. METODOLOGIA

4.1. Reagentes e Soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e sem purificação adicional. Todas as dispersões e soluções aquosas foram preparadas em água ultrapura purificada em sistema Milli-Q[®] (Millipore) com resistividade de 18,2 MΩ cm à temperatura ambiente ($\approx 25\text{ }^{\circ}\text{C}$).

A solução do eletrólito de suporte, tampão fosfato salino (PBS) 0,01 mol L⁻¹ em pH 7,4, foi preparada a partir da dissolução dos sais de KCl, NaCl, Na₂HPO₄ e KH₂PO₄ em água ultrapura.

O anticorpo (ab-TnT), foi preparado na concentração de 1000 ng mL⁻¹ (solução estoque) em PBS (0,01 mol L⁻¹, pH 7,4). O antígeno (TnT) também foi preparado em PBS em concentrações de 0,05 a 0,35 ng mL⁻¹. Ambos reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

A sonda redox, solução de hidroquinona (Sigma-Aldrich) 3,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ foi preparada diariamente em PBS (0,01 mol L⁻¹, pH 7,4).

As AuNP-Hep foram sintetizadas segundo procedimento: inicialmente, 100 μL de uma solução 0,1 mol L⁻¹ de ácido cloroáurico (Sigma-Aldrich), foram adicionados a 10 mL de solução de heparina (Bioibérica) 0,5% (m/v) sob agitação mecânica. Em seguida, foram adicionados 200 μL de uma solução 20 mmol L⁻¹ de borohidreto de sódio (Nuclear) preparado em água ultrapura gelada para a redução do Au³⁺ presente no ácido cloroáurico e deixado sob agitação durante 30 minutos.

A solução de Nafion (Sigma-Aldrich), utilizada para auxiliar na fixação do filme sobre a superfície do eletrodo, foi preparada na concentração 10 μL mL⁻¹ em água ultrapura.

A suspensão de xGnP (XG Science) foi obtida dispersando-se 1 mg de nanoplaquetas em 200 μL da suspensão de AuNP-Hep em cuba de ultrassom por 10 minutos.

Compostos presentes em amostras biológicas tais como: glicose (200 mg L⁻¹), ácido ascórbico (10 mg L⁻¹), ácido úrico (10 mg L⁻¹), dopamina

(10 mg L⁻¹), creatina (10 mg L⁻¹) e creatinina (4,2 mg L⁻¹), adquiridos da Sigma-Aldrich, foram preparados em solução PBS (0,01 mol L⁻¹, pH 7,4) e testados como possíveis interferentes na resposta do imunossensor.²²

Amostras de plasma sanguíneo humano liofilizado (Sigma-Aldrich) com adições de antígeno foram utilizadas para a determinação de TnT utilizando o imunossensor proposto.

4.2. Equipamentos

Para a realização das medidas voltamétricas utilizou-se um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 12 conectado a um computador equipado com o software de processamento de dados NOVA versão 1.10. Foi utilizada uma célula de vidro com capacidade para 15 mL e três eletrodos, como eletrodo de referência foi utilizado o Ag/AgCl, como eletrodo auxiliar foi utilizada uma placa de platina (0,5 cm²) e como eletrodo de trabalho o imunossensor proposto. Todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente.

As medidas de pH foram realizadas em um pHmetro (Micronal, modelo B-475) equipado com um eletrodo de vidro combinado, após calibração do equipamento com soluções padrão de pH 4,0 e 7,0.

A dispersão das nanoplaquetas foi realizada em uma cuba de ultrassom (Cristófoli).

A secagem do filme sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo foi realizada em dessecador acoplado a uma bomba de vácuo.

4.3. Construção do Imunossensor

Após o pré-tratamento da superfície do eletrodo de carbono vítreo através de limpeza mecânica com alumina (0,5 µm) sobre feltro, para eliminar impurezas adsorvidas, 2,0 µL da solução previamente preparada de Nafion foram gotejados sobre a superfície do eletrodo e deixado em dessecador (sob vácuo) por 10 minutos para secagem.

Em um eppendorf®, foram misturados 20,0 µL da dispersão de

AuNP-Hep/xGnP com 20,0 μL da solução de ab-TnT. Em seguida, 2,0 μL desse material foram gotejados sobre o filme formado pelo Nafion e deixado em dessecador por 10 minutos para secagem. Logo após foram aguardados 15 minutos para imobilização do anticorpo (ab-TnT). Finalizada a construção do imunossensor pode-se realizar a medida de corrente para obtenção do pico base.

Para as otimizações e construção da curva de calibração, 2,0 μL de solução padrão de antígeno (TnT) foram gotejados sobre o imunossensor. Após o tempo de incubação de 20 minutos, para ligação do antígeno ao anticorpo imobilizado, o imunossensor foi lavado com PBS para realização das medidas.

4.4. Construção da Curva de Calibração

A curva de calibração foi construída a partir de adições consecutivas de TnT: 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30 e 0,35 ng mL^{-1} sobre a superfície do imunossensor aguardando o tempo de incubação do antígeno (20 minutos). Para cada medida foi calculada a supressão do sinal em relação ao pico base, gerando a curva de calibração que relaciona supressão de sinal com a concentração de TnT adicionada.

4.5. Estudo dos Possíveis Interferentes

O estudo de possíveis interferentes (glicose, ácido ascórbico, ácido úrico, dopamina, creatina, creatinina) presentes na amostra, foi realizado adicionando 2,0 μL da solução do interferente sobre a superfície do imunossensor. As soluções foram incubadas da mesma forma que para o antígeno (20 minutos). A avaliação de interferência foi realizada medindo o pico após incubação com os compostos interferentes e comparando com o pico base (antes da incubação).

4.6. Determinação de TnT em Plasma

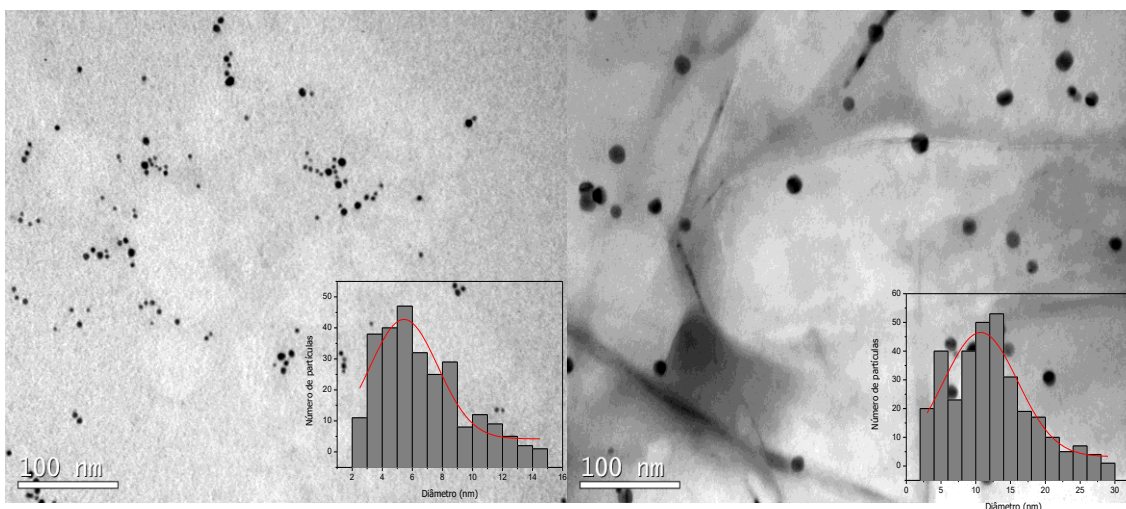
Para realizar a determinação de TnT em plasma, uma concentração de $0,3 \text{ ng mL}^{-1}$ de TnT foi adicionada à solução de plasma sanguíneo humano comercial. Uma alíquota de $2,0 \text{ }\mu\text{L}$ dessa solução foi gotejada sobre a superfície do imunossensor, sendo incubada pelo mesmo tempo utilizado para a solução padrão do antígeno (20 minutos). Em seguida, foi realizada a medida da corrente e comparada com a resposta gerada pela solução padrão de mesma concentração de analito em PBS.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização das AuNP-Hep

A dispersão de AuNP-Hep foi caracterizada através de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) a fim de verificar o tamanho das partículas e avaliar a eficiência do estabilizante (heparina) em evitar a coalescência do material. Como pode ser observado na Figura 4 (a), as partículas são esféricas, possuem tamanhos distintos e estão bem dispersas, não apresentando sinal de agregação. As partículas apresentaram diâmetro médio de $5,45 \pm 2,25$ nm indicando a formação de partículas nanométricas. A Figura 4 (b) mostra as AuNP-Hep sobre a superfície das xGnP. A contagem das partículas foi feita com o auxílio do software *Image J* a partir de um conjunto de aproximadamente 300 partículas escolhidas aleatoriamente das imagens de TEM.

Figura 4. (a) Imagem de TEM para as AuNP-Hep. Inserido: histograma referente à aproximadamente 300 partículas escolhidas arbitrariamente as imagens de TEM. (b) Imagem de TEM para as AuNP-Hep/xGnP.



5.2. Otimização do Método

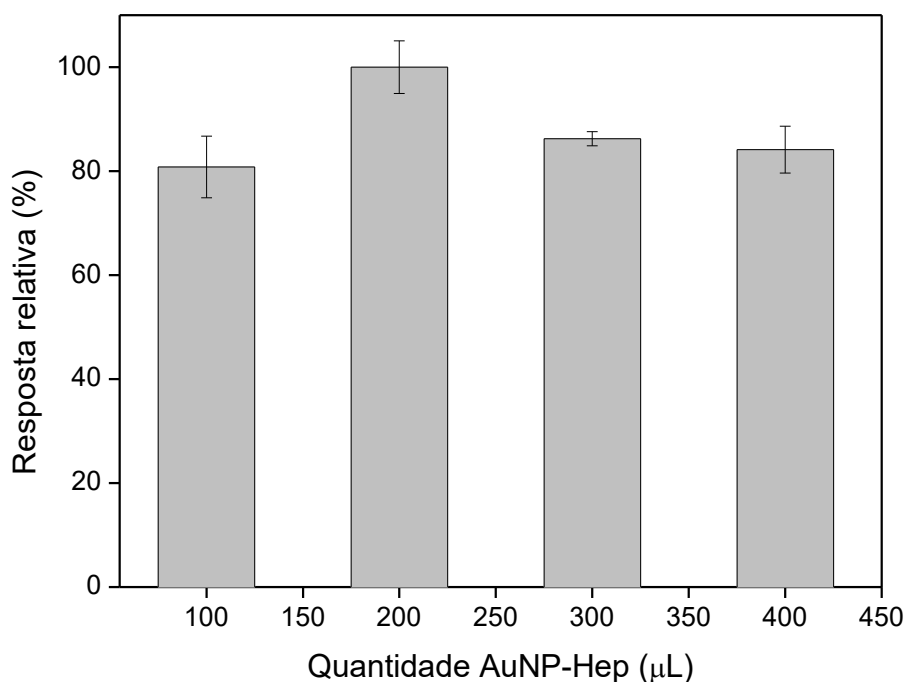
Com o intuito de obter a maior resposta eletroquímica para o imunossensor proposto foram estudados parâmetros como proporção dos modificadores, tempo de imobilização do anticorpo e incubação do antígeno e

parâmetros da técnica de pulso diferencial (incremento, amplitude e intervalo de tempo).

5.2.1 Proporção dos Modificadores

As proporções dos modificadores usados para construção do imunossensor foram investigadas a fim de melhorar o desempenho analítico do método. Inicialmente, foram estudados volumes de AuNP-Hep de 100 a 400 μL para 1 mg de xGnP, obtendo melhor resposta usando a proporção 200 μL /1 mg (AuNP-Hep/xGnP), Figura 5. Essa proporção foi selecionada para os estudos posteriores.

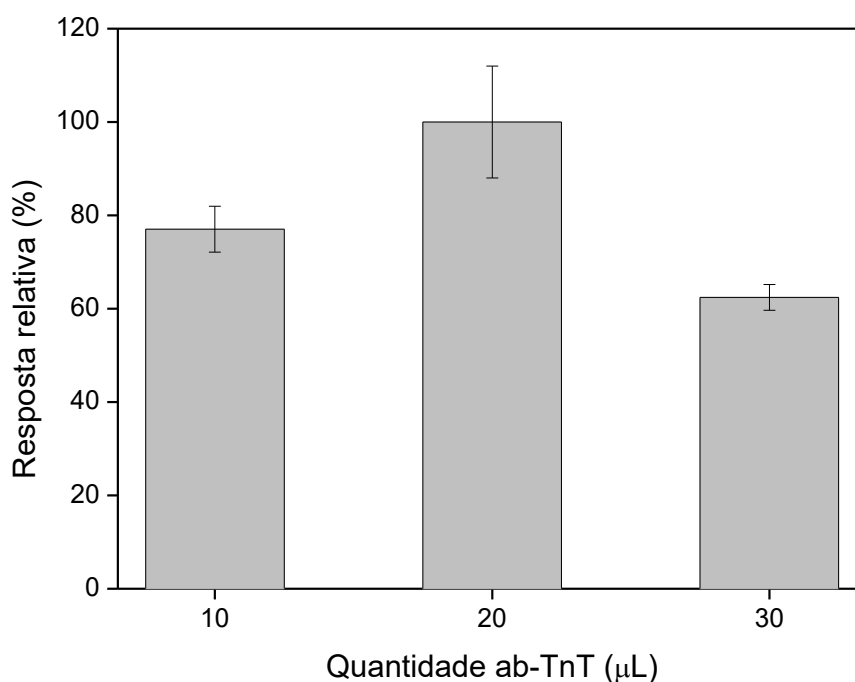
Figura 5. Estudo da influência da proporção AuNP-Hep/xGnP sobre a resposta do imunossensor.



Em seguida, foi estudada a quantidade de ab-TnT que gerou maior supressão de corrente, significando maior eficiência de imobilização. Foram estudados volumes de 10,0 a 30,0 μL de solução ab-TnT para 20,0 μL de dispersão AuNP-Hep/xGnP. As respostas obtidas foram plotadas segundo a Figura 6. O estudo demonstrou que a quantidade de 20,0 μL de solução de

ab-TnT gera a maior resposta de corrente para o imunossensor. Essa proporção foi a selecionada para os estudos posteriores.

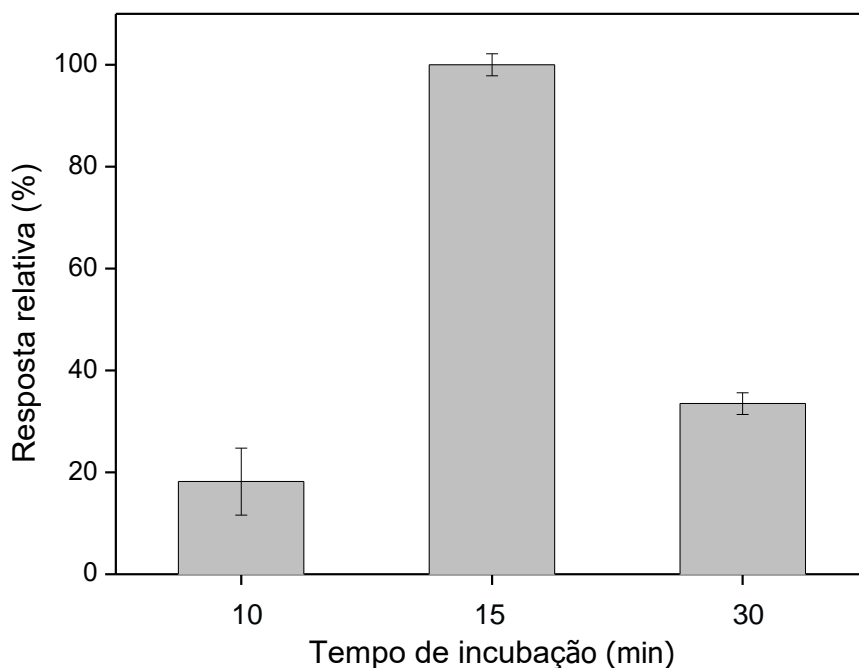
Figura 6. Estudo da influência da quantidade de ab-TnT sobre a resposta do imunossensor.



5.2.2. Estudo do Tempo de Imobilização do Anticorpo e Incubação do Antígeno

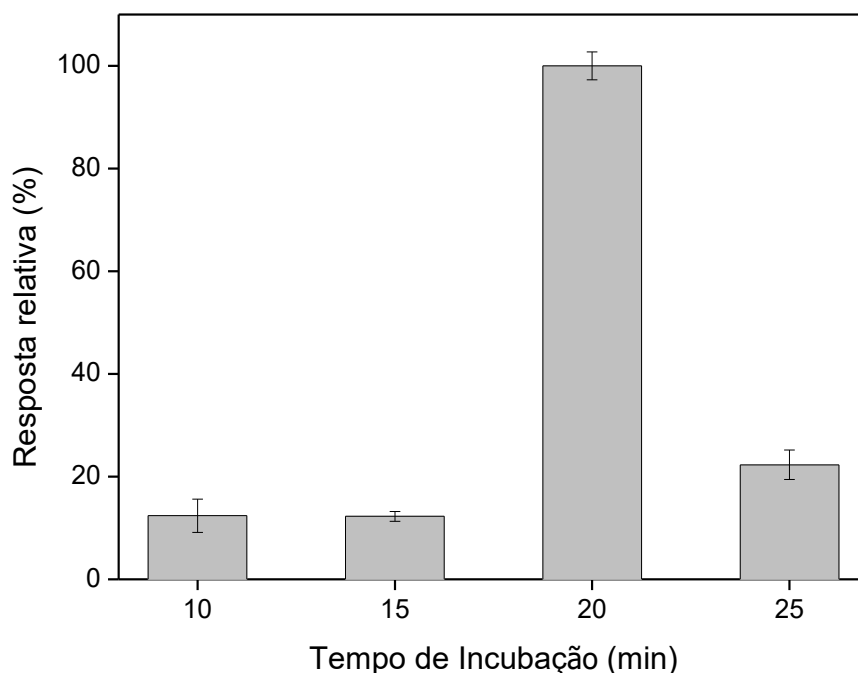
Para que o anticorpo seja imobilizado na superfície do imunossensor é necessário um determinado tempo para que haja uma interação eficiente com o nanomaterial. O tempo de imobilização do anticorpo foi estudado na faixa de 10 a 30 minutos acompanhando a supressão no sinal de corrente gerada devido a presença do anticorpo. A melhor resposta ocorreu em 15 minutos, sendo selecionado este tempo de imobilização. Os resultados encontram-se na Figura 7.

Figura 7. Estudo do tempo de imobilização do anticorpo.



Para que a formação do imunocomplexo ocorra efetivamente é necessário um tempo de incubação após a adição do antígeno. Para avaliar o tempo necessário para que ocorra essa interação, foram gotejados 2 μL de solução $0,3 \text{ ng mL}^{-1}$ de TnT sobre o imunossensor e avaliada a supressão gerada em relação ao pico base. Foram avaliados tempos de 10 a 25 minutos. A melhor resposta foi obtida para 20 minutos, sendo este o tempo de incubação selecionado. Os resultados encontram-se na Figura 8.

Figura 8. Estudo do tempo de incubação do antígeno.

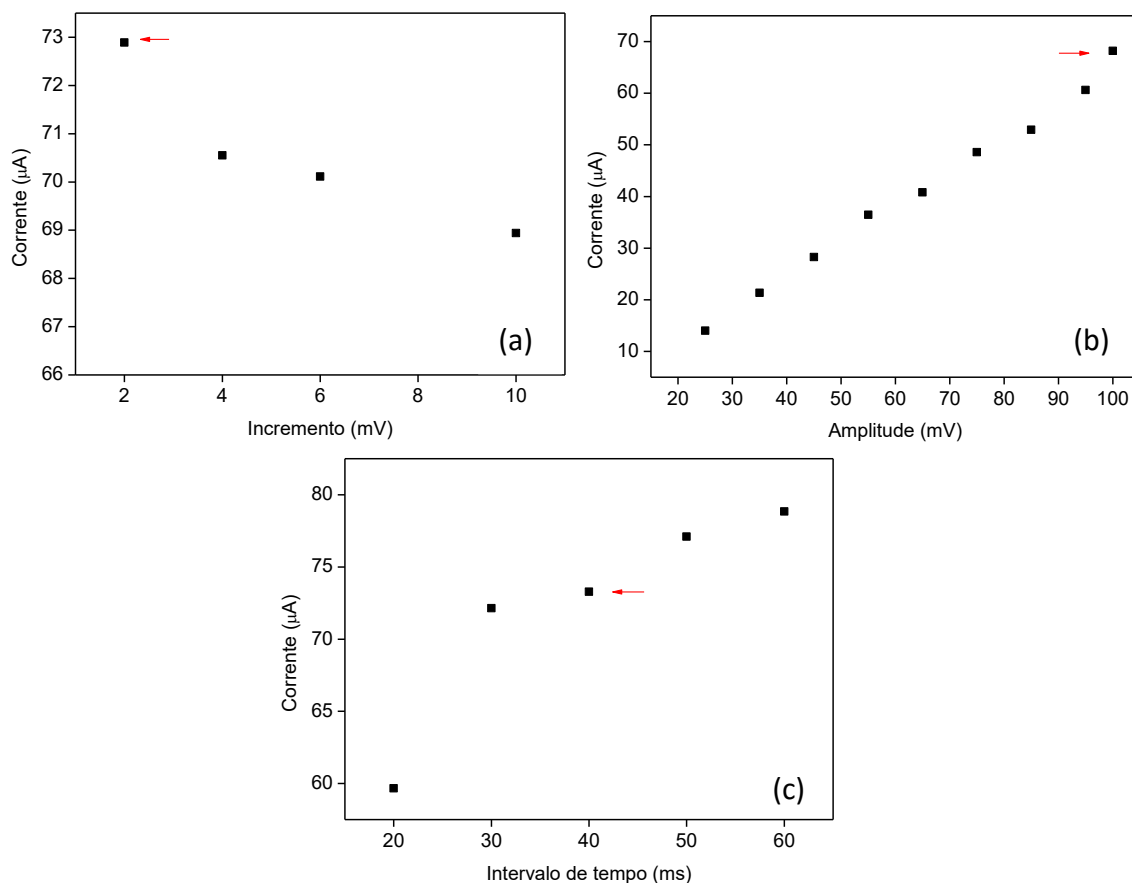


5.2.3. Otimização dos Parâmetros da DPV

Foi realizado estudo dos parâmetros voltamétricos da técnica de pulso diferencial (incremento, amplitude e intervalo de tempo) a fim de escolher os valores que gerariam maior resposta de corrente, sem comprometer o perfil voltamétrico. Para o estudo de cada parâmetro os outros dois foram fixados.

Para o incremento foram estudados valores de 2,0 a 10,0 mV sendo escolhido o valor de 2,0 mV, uma vez que gerou maior resposta de corrente (Figura 9 (a)). O mesmo critério foi utilizado para a escolha do valor de amplitude, estudada de 25,0 a 100,0 mV, sendo escolhido o valor de 100,0 mV (Figura 9 (b)). Para o intervalo de tempo foram estudados valores de 20 a 60 ms, e selecionado o valor de 40 ms por apresentar maior resposta, rapidez na medida e perfil do voltamograma melhor definido (Figura 9 (c)).

Figura 9. Estudo do efeito dos parâmetros da técnica de pulso diferencial na resposta analítica do imunossensor: (a) incremento (2 – 10 mV); (b) amplitude (25 – 100 mV); (c) intervalo de tempo (20 – 60 ms).

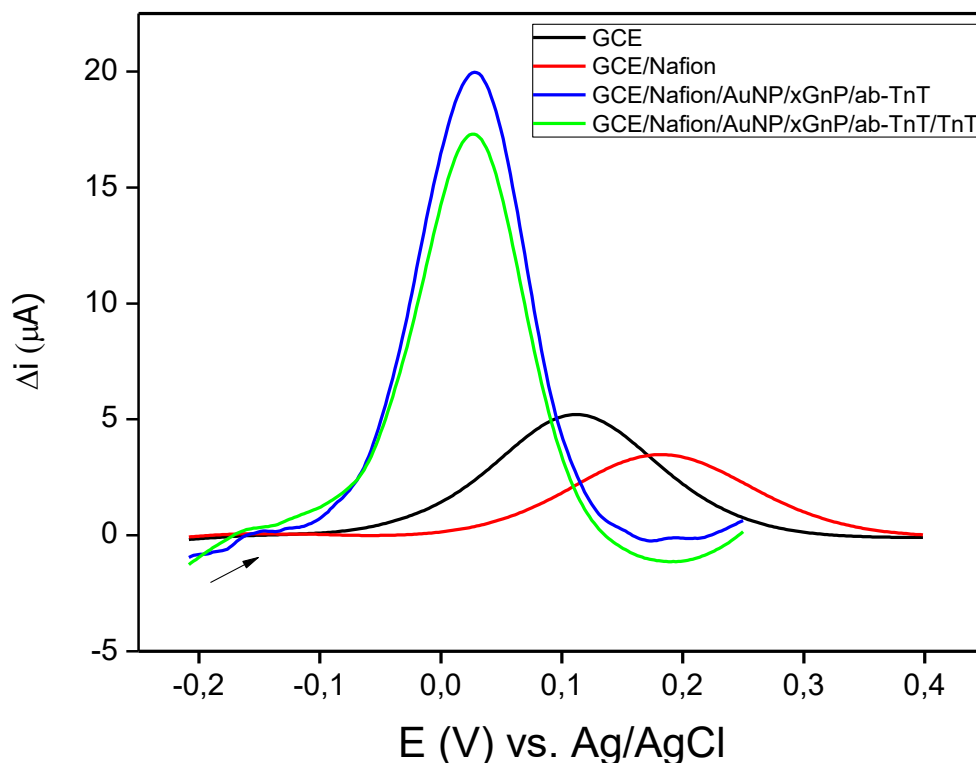


5.3. Avaliação dos Componentes Utilizados na Construção do Imunossensor

Neste estudo foi avaliada a contribuição de cada modificador, separadamente, sobre a resposta do imunossensor, por DPV. Nos voltamogramas representados na Figura 10, pode-se observar na curva em preto a resposta de corrente para a hidroquinona referente à medida realizada com GCE não modificado. Em vermelho, percebe-se uma pequena diminuição de corrente que é referente a adição do Nafion (que devido à presença de suas cadeias poliméricas volumosas causa um leve bloqueio da superfície). Em azul, observa-se a resposta após a adição da dispersão de AuNP-Hep/xGnP/ab-cTnT demonstrando um grande aumento na resposta de corrente em relação as curvas anteriores devido à presença do nanomaterial.

Em verde, encontra-se a resposta após a adição de solução $0,3 \text{ ng mL}^{-1}$ de antígeno que promove a formação do imunocomplexo causando supressão da corrente em relação a curva azul.

Figura 10. Estudo da contribuição dos modificadores na construção do imunossensor.

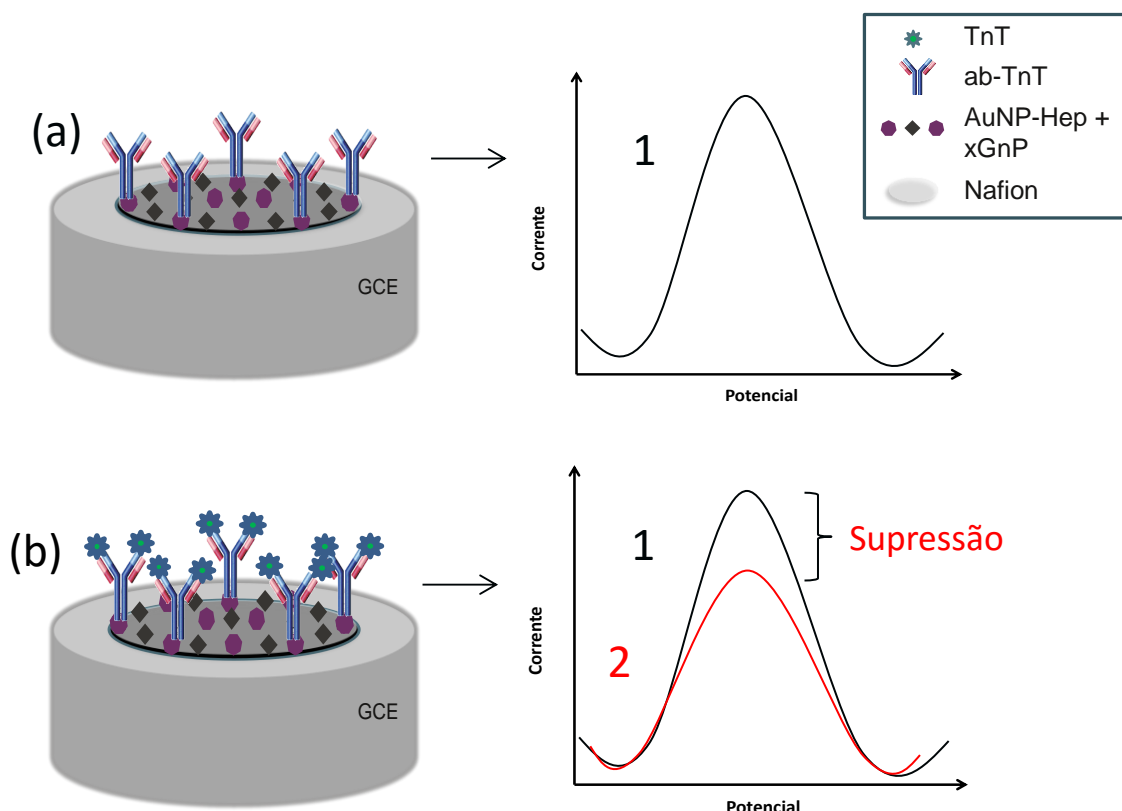


5.4. Princípio de Funcionamento do Imunossensor

O imunossensor funciona da seguinte maneira: inicialmente a hidroquinona, utilizada como sonda redox, é oxidada na superfície do imunossensor (ausência de antígeno) gerando uma resposta de corrente denominada pico base, conforme esquematizado na Figura 11 (a). Em seguida, adiciona-se o antígeno sobre o imunossensor, ocorrendo a formação do imunocomplexo entre o antígeno (analito) e o anticorpo (ab-TnT) imobilizado, como esquematizado na Figura 11 (b). Realiza-se nova medida e a hidroquinona oxida-se novamente. É possível perceber uma supressão do sinal de corrente referente à oxidação da hidroquinona em relação ao pico base

devido ao bloqueio parcial da superfície eletroativa devido a formação do imunocomplexo. Esta supressão pode ser então relacionada à concentração de TnT adicionada na superfície do sensor.

Figura 11. (a) Obtenção do pico base. (b) Esquema da formação do imunocomplexo e supressão em relação ao pico base.



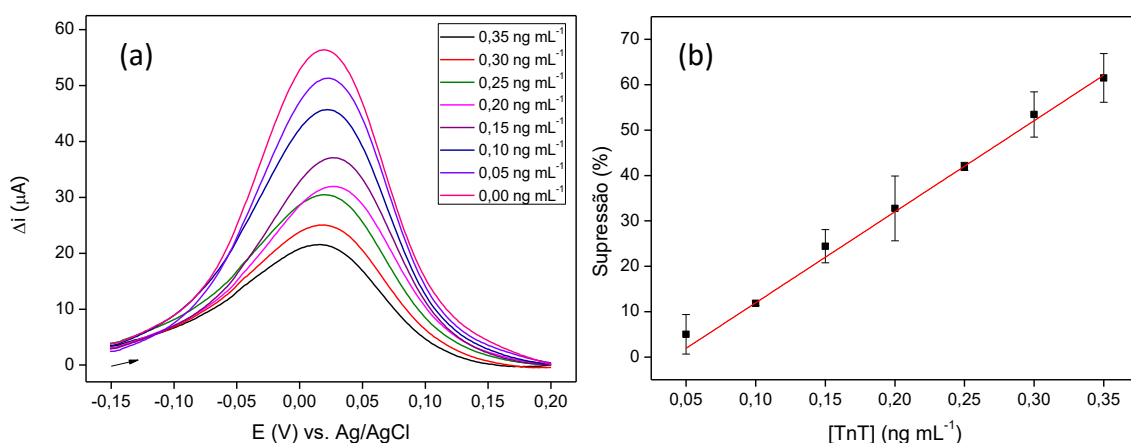
5.5. Desempenho Analítico do Imunossensor

5.5.1. Curva de Calibração

A Figura 12 (a) mostra os voltamogramas e a Figura 12 (b) a curva de calibração construída, a partir de adições consecutivas de concentrações crescentes de troponina T sobre a superfície do imunossensor, em condições otimizadas. A cada medida foi calculada a supressão em relação ao pico base. A curva apresentou linearidade na faixa de 0,05 a 0,35 ng mL⁻¹, compreendendo a concentração utilizada para diagnóstico de IAM

(0,30 ng mL⁻¹) com a equação: $\Delta i = -8,11 (\pm 1,06) + 200,64 [\text{TnT}] (\pm 6,62)$ onde Δi representa a supressão da corrente em relação ao pico base. O coeficiente de correlação (R^2) médio encontrado foi de 0,997 e o limite de detecção foi de 0,016 ng mL⁻¹, calculado a partir dos parâmetros da curva de calibração ($LOD = \frac{3 \cdot Sb}{a}$, onde Sb é o desvio padrão do intercepto e a é a inclinação da reta).

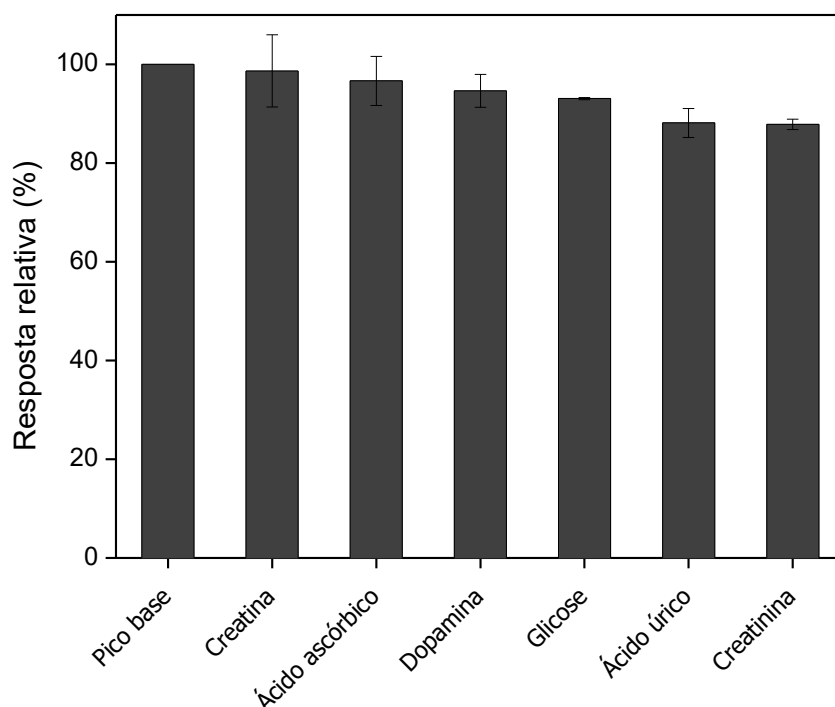
Figura 12. Voltamogramas (a) e curva de calibração (b) para troponina T utilizando o imunossensor proposto em condições otimizadas.



5.5.2. Estudo dos Possíveis Interferentes

A fim de avaliar possíveis interferentes sobre a resposta do imunossensor na determinação de troponina T, compostos como glicose, ácido ascórbico, ácido úrico, dopamina, creatina e creatinina, presentes em amostras de plasma sanguíneo, foram testados. Na Figura 13 encontram-se os níveis de interferência gerados por cada uma dessas substâncias testadas. É possível notar que, os compostos avaliados não apresentaram interferência significativa, sendo que, a maior interferência foi causada pela creatinina (12,15 %).

Figura 13. Estudo dos possíveis interferentes presentes no plasma sanguíneo.



5.5.3. Determinação de TnT em Plasma

Para testar o funcionamento do imunossensor, solução de plasma humano liofilizado em pH fisiológico (7,4) com adição de TnT na concentração de $0,3 \text{ ng mL}^{-1}$ foi preparada e quantificada por DPV. As medidas foram realizadas em triplicatas e uma concentração média de $0,32 (\pm 0,02) \text{ ng mL}^{-1}$ foi determinada. O erro médio para a detecção foi de 6,7%, considerado aceitável para esse tipo de amostra. O resultado satisfatório, mostra que o imunossensor proposto é adequado para a determinação de TnT em plasma.

6. CONCLUSÃO

Após a otimização dos parâmetros experimentais, os resultados obtidos para o imunossensor desenvolvido foram bastante satisfatórios cumprindo os objetivos propostos. O imunossensor apresentou vantagens em relação aos métodos atuais de quantificação de TnT, relacionadas a facilidade na construção, boa sensibilidade e baixo limite de detecção (devido a presença dos nanomateriais utilizados como modificadores), linearidade na faixa de interesse, baixa interferência de substâncias presentes na matriz e baixo erro de determinação em plasma. Além disso, requer pouco tempo de incubação o que possibilita um diagnóstico rápido (cerca de 20 minutos), mostrando-se uma ferramenta útil para o diagnóstico precoce do infarto agudo do miocárdio.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MOINA, C., YBARRA, G. **Fundamentals and Applications of Immunosensors, Advances in Immunoassay Technology**. InTech, 65-77, 2012.
2. ZAPP, E, WESTPHAL, E., GALLARDO, H., SOUZA, B., VIEIRA, I. C. Liquid crystal and gold nanoparticles applied to electrochemical immunosensor for cardiac biomarker. **Biosens. Bioelettron.**, 59, 127-133, 2014.
3. RICCARDI, C. S., COSTA, P. I., YAMANAKA, H. Imunossensor amperométrico. **Quím. Nova**, 25, 2, 316-320, 2002 .
4. LIU, L., CHAO, Y., CAO, W., WANG, Y., LUO, C., PANG, X., FAN, D., WEI, Q., A label-free amperometric immunosensor for detection of zearalenone based on trimetallic Au-core/AgPt-shell nanorattles and mesoporous carbon. **Anal. Chim. Acta.**, 847, 29-36, 2014.
5. LIANG, R.; FAN, L.; HUANG, D.; QIU, J. A Label-free Amperometric Immunosensor Based on Redox-active Ferrocene-branched Chitosan/multiwalled Carbon Nanotubes Conductive Composite and Gold Nanoparticles. **Electroanalysis**, 23, 719–727, 2011.
6. SILVA, B.V., CAVALCANTI, I.T., SILVA, M.M., DUTRA, R.F. A carbon nanotube screen-printed electrode for label-free detection of the human cardiac troponin T. **Talanta**, 117, 431-437, 2013.
7. ZAPP, E., SILVA P. S., WESTPHAL, E., GALLARDO, H., SPINELLI, A., VIEIRA, I. C. Troponin T immunosensor based on liquid crystal and silsesquioxane-supported gold nanoparticles. **Bioconjugate Chem.** 25, 1638–1643, 2014.
8. JOHNSON, L. R. **Essencial medical physiology**. Elsevier, 3rd Edition, 126, 2003.

9. SMELTZER, S. C. **Brunner and Studdarth's textbook of medical-surgical nursing**. Lippincott USA. 12th Edition, 770, 2009.
10. BRONDANI, D., PIOVESAN, J. V., WESTPHAL, E., GALLARDO, H., DUTRA, R. A. F., SPINELLI, A., VIEIRA, I. C. A label-free eletrochemical immunosensor based on an ionic organic molecule and chitosan-stabilized gold nanoparticles for the detecton of cardiac troponin T. **Analyst**. 139, 5200–5208, 2014.
11. CAMPBELL, F. W., COMPTON, R. G. The use of nanoparticles in electroanalysis: an updated review. **Anal. Bioanal. Chem.** 396, 241-259, 2010.
12. KARUNAKARAN, C., BHARGAVA, K., BENJAMIN, R., **Biosens. Bioelettron.** Elsevier. 1st Edition, 87, 2015.
13. SILVA, T. R., BRONDANI, D., ZAPP, E., VIEIRA, I. C. Eletrochemical sensor based on gold nanoparticles stabilized in poly(allylamine hydrochloride) for determination of vanillin. **Electroanalysis**. 27, 465-472, 2015.
14. YIN, T., QIN, W. Applications of nanomaterials in potentiometric sensors. **Trends Anal. Chem.**, 51, 79–86, 2013.
15. PINGARRÓN, J. M., YÁÑEZ-SEDEÑO, P., GONZÁLEZ-CORTÉS, A. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. **Electrochim. Acta.**, 53, 5848–5866, 2008.
16. ION, A. C., ION, I., CULETU, A., GHERASE, D., MOLDOVAN, C. A., IOSUB, R., DINESCU, A. Acetylcholinesterase voltammetric biosensors based on carbon nanostructurechitosan composite material for organophosphate pesticides. **Mater. Sci. Eng. C.**, 30, 817–821, 2010.

17. LU, J., DRZAL, L. T., WORDEN, R. M., LEE, I. Simple fabrication of a highly sensitive glucose biosensor using enzymes immobilized in exfoliated graphite nanoplatelets nafion membrane. **Chem. Mater.**, 19, 6240–6246, 2007.
18. ION, I., ION, A. C. Application of an exfoliated graphite nanoplatelet-modified electrode for the determination of quitozen. **Mater. Sci. Eng. C.**, 31, 7, 1553–1557, 2011.
19. SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Quím. Nova**, 26, 1, 81-89, 2003.
20. SKOOG, D. A, WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**, Thomson Learning, 2006. Tradução da 8ª ed. Norte americana.
21. PACHECO, W. F., SEMAAN, F. S., ALMEIDA, V. G. K., RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Rev. Virtual Quím.**, 5 (4), 516-537, 2013.
22. KREBS, H.A., **Annu. Rev. Biochem.** 19, 409-430, 1950